

### PCR License

This product is offered under a licence for the manufacture and the sale of veterinary PCR products from ROCHE. The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing veterinary in vitro diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

# TaqVet™ Bluetongue Virus All Genotypes

Réf:

BTVM: 100 Tests

BTVM/10: 1000 Tests (10 x BTVM)

Pour la détection du virus de la Bluetongue (BTV)  
responsable de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO)  
dans:

Sang EDTA

Rate

Avortons (rate, foie, cœur)

Par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel

Validation officielle du kit par :

- Le laboratoire national de référence FCO : LNR FCO de Maisons Alfort.
- Le laboratoire international de référence de l'OIE : IAH (Institute for Animal Health) de Pirbright (UK).

Kit validé en partenariat avec  
Le laboratoire départemental de la Nièvre



### Modification de la notice :

Changement de la nomenclature  
du kit

Pas de changement du protocole



# LSI

## Laboratoire Service International

6 Allée des écureuils  
Parc d'activité du Bois Dieu  
69380 LISSIEU – France  
Tel : +33( 0)4 72 54 82 82  
Fax : +33 (0)4 72 54 82 83  
[contact@lsivet.com](mailto:contact@lsivet.com)  
[www.lsivet.com](http://www.lsivet.com)

Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 18h.  
Office open from Monday until Friday: 9 am to 6 pm.

**Marketing & Commercial / *Marketing & Sales***  
**Informations commerciales / *Sales Information***  
Lise GREWIS – [lise@lsivet.com](mailto:lise@lsivet.com)  
Damien MAGNEE – [damien.d@lsivet.com](mailto:damien.d@lsivet.com)  
Gaëlle RANALDI – [gaelle@lsivet.com](mailto:gaelle@lsivet.com)  
Stéphanie COLIN – [stephanie@lsivet.com](mailto:stephanie@lsivet.com)

**Informations PCR / *PCR Information***  
**Support Technique PCR / *PCR Technical Information***  
Sandrine Moine  
Julie Charrot  
Tel : +33( 0)4 72 54 82 82  
[contact@lsivet.com](mailto:contact@lsivet.com)

**Informations Légales / *Legal Information***  
LSI – Laboratoire Service International  
SAS / capital of 120 000,00 Euros  
VAT : FR67380105544  
RCS : 38010554400064 APE : 2120Z

# TaqVet™ Bluetongue Virus

## All genotypes

Réf: BTVM  
100 tests  
Réf : BTVM/10  
1000 tests

### Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Réactifs fournis dans le Kit	4
III. Matériel et réactifs non fournis et conseillés	5
IV. Préparation des échantillons	6
V. Extraction de l'ARN en colonne	7
VI. Extraction de l'ARN en plaque	9
VII. Automatisation de l'extraction de l'ARN	10
VIII. Reconstitution des Mix réactionnels	10
IX. Dénaturation des ARNs viraux	10
X. Protocole d'amplification	10
X-a / Sur un thermocycleur ABI 7000, 7300 ou 7500	
X-B / Sur un thermocycleur Light Cycler 2.0	
XI. Interprétation des résultats	13

# TaqVet™ Bluetongue Virus

## All genotypes

### I - Introduction

La Fièvre Catarrhale Ovine (FCO ou bluetongue en anglais) est une maladie infectieuse virale vectorielle non contagieuse des moutons, inscrite à la liste A de l'Office International des Epizooties. Elle est due à l'infection par un virus de la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus*. Il existe 24 sérotypes différents de ce virus.

Le virus de la FCO est essentiellement **réputé dangereux** pour les **ovins** : il entraîne une importante morbidité ainsi qu'une forte mortalité. De même, le virus infecte **les bovins, les caprins et autres ruminants sauvages** mais n'entraîne qu'exceptionnellement des manifestations cliniques chez ces espèces (Lefèvre et Desoutter, 1998).

La transmission du virus se fait presque exclusivement par piqûre infectante d'un petit diptère hématophage appartenant à la famille des *Ceratopogonidae*, genre *Culicoides*. Il existe plus de 1400 d'espèces de *Culicoides*. Seules certaines d'entre elles sont capables de transmettre l'infection : *C. imicola* et *C. bolitinos* pour l'Afrique et *C. imicola* pour le sud de l'Europe, *C. variipennis*, *C. sonorensis* et *C. insignis* pour l'Amérique et *C. fulvus* pour l'Australie. Toutefois, d'autres espèces sont fortement suspectées de jouer un rôle dans la transmission avec notamment pour l'Europe, *C. pulicaris* et *C. obsoletus*. Le vecteur s'infecte par repas de sang pris sur animal infectant. Puis, il multiplie le virus jusqu'à une dose nécessaire pour sa transmission à d'autres animaux réceptifs.

Le kit TaqVet™ Bluetongue Virus All Genotypes (BTVM) de LSI permet la détection des 24 génotypes de la Bluetongue recensés à travers le monde et répertoriés par l'Institute for Animal Health de Pirbright (GB).

Les échantillons trouvés positifs à l'aide du kit TaqVet™ BTVM de LSI pourront être génotypés :

- Pour le type 8 avec le kit TaqVet™ BTV8 genotyping (ref : BTV8G)
- Pour le type 1 avec le kit TaqVet™ BTV1 genotyping (ref : BTV1G)

Dans ce cas, il est possible de travailler directement à partir des ARN positifs en recherche FCO tout génotype s'ils ont été conservés à -20° C dès leur extraction.

NB : le kit TaqVet™ BTVM détecte également un virus voisin de la bluetongue (ayant le même vecteur), le virus EHDV (Epizootic Hemorrhagic Disease Virus) non présent en Europe.

### II - Réactifs fournis dans le Kit

Le kit contient les éléments suivants :

- **Mix BTVM** : Mix prêt à l'emploi **Bluetongue Virus All genotypes** contenant :

- 1 Set de Nucléotides BTVM :
  - 1 Forward primer
  - 1 Reverse primer
  - 1 Sonde BTVM - Sonde TaqMan® marquée FAM - MGB (indiquer « none » en Quencher)
- 1 Set de Nucléotides IPC :
  - 1 Forward primer
  - 1 Reverse primer
  - 1 Sonde IPC - Sonde TaqMan® marquée VIC - TAMRA
- Le Mix réactionnel RT-PCR
- L'enzyme spécifique RT-PCR

- **EPC BTVM** : External Positive Control BTVM **déjà extrait**

Rq : Pour des petites séries d'analyses (inférieures à 25 échantillons), l'EPC peut être dilué extemporanément au 1/10<sup>ème</sup> (par ex, 10 µl d'EPC + 90 µl d'eau Dnase Rnase free) **mais cette dilution ne doit pas être conservée ultérieurement.**

Le mix BTVM de RT-PCR est prêt à l'emploi, il ne nécessite donc aucune reconstitution de mix de réactif avant l'ajout de l'extrait d'ARN à tester.

Le kit TaqVet™ Bluetongue Virus All Genotypes se présente sous la forme d'un coffret à conserver à -20°C. Les réactifs contenus dans les kits ne doivent pas être décongelés plus de 3 fois. Les réactifs seront aliquotés si le nombre d'analyses nécessite plus de 3 décongelations.

L'extraction et la purification de l'ARN viral sont réalisées avec (au choix):

- Le Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Réf 52904 : 50 extractions ou 52906 : 250 extractions / Qiagen)
- Le kit Nucleospin RNA Virus (Réf 740956.10 : 10 extractions ; 740956.50 : 50 extractions ; 740956.250 : 250 extractions / Macherey Nagel)

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Référence	Packaging	Code Couleur	Conservation	
				Avant Réception	Après Ouverture
Mix BTVM	MBTVM	tube	Vert	-20°C	-20°C
EPC BTVM	EPCBTVM	tube	Marron	-20°C	-20°C

**Attention** : Le Contrôle Négatif utilisé dans la réaction n'est pas fourni dans le Kit. LSI recommande d'utiliser de l'eau RNase Free utilisée par le laboratoire pour la réalisation des extractions et de la préparation du Mix.

2 types de Contrôle Négatif peuvent être utilisés :

**1/ NCS : Negative Control « Sample »** : Eau RNase Free extraite comme un échantillon. Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de l'amplification et de l'extraction. **Prévoir 2 NCS pour une plaque.**

**2/ NC : Negative Control** : Distribuer 25 µl de « Mix BTVM » dans une cupule de la plaque d'amplification. Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

### III -Matériel et réactifs non fournis et conseillés par LSI

Pour l'amplification :

- Thermocycleur en temps réel.
- Consommables plastiques (plaques, microtubes...) compatibles avec le thermocycleur en temps réel.
- ARN A et B fournis par le LNR comme témoins positifs de RT-PCR (non obligatoire).
- DMSO : ref LSI DMSO

Pour l'extraction d'ARN :

- Une centrifugeuse pour microtubes de type Eppendorf (8 à 15 000 g).
- Un vortex ou équivalent.
- Micropipette de précision (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL).
- Pointes à filtres Rnase free (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL).
- Microtubes Rnase free de 1,5mL (type Eppendorf ou équivalent).
- Kit QIAamp Viral RNA mini kit (réf : 52906).
- Kit Nucleospin RNA Virus (réf : 740956.250)
- Tubes collecteurs de 2mL.
- Ethanol 100%.
- Eau RNase qui servira de Contrôle Négatif.
- Solution d'eau physiologique (correspond à une solution contenant 9g de chlorure de sodium par litre d'eau distillée).
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Hotte à extraction chimique
- Bac réfrigérant
- Bain à sec chauffant
- Consommables plastiques (plaques, microtubes...) compatibles avec le thermocycleur en temps réel.
- Tubes adaptables aux plaques 96 puits

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués.

## IV -Préparation des échantillons

Les règles d'hygiène et de sécurité à prendre en considération relèvent des procédures pour la manipulation de tissus biologiques potentiellement infectieux et des procédures de manipulation des produits chimiques.

### 1/ Sangs EDTA

Pour le diagnostic de la FCO, les prélèvements biologiques analysés sont des sangs (issus de bovins, d'ovins ou de caprins) reçus à +4°C (attention ne pas congeler). Le sang doit avoir été **impérativement prélevé dans un tube anticoagulant EDTA**. Dès réception, les sangs sont **conservés à 4°C** jusqu'à utilisation, maximum 4 jours. Après utilisation (extraction), conserver l'échantillon à - 80°C.

### 2/ Organes

Dans le cas d'avortons ou d'animal mort, il est possible de travailler à partir de prélèvements tels que la rate, le foie et le cœur. Après le prélèvement d'un organe, il existe 2 traitements :

a/ L'organe est prélevé à proximité du laboratoire PCR (Salle d'autopsie par exemple)

Deux procédures sont ensuite possibles :

- soit réaliser l'extraction de l'ARN immédiatement.
- soit congeler les morceaux découpés à -20°C.

b/ L'organe est prélevé à distance du laboratoire réalisant les analyses PCR, il est conseillé :

- soit de faire voyager l'organe à +4°C (Transport < 24 heures).
- soit de congeler l'organe (Transport > 24 Heures).

#### ● **Préparation des organes (Rate, foie, cœur,...) :**

1. Disséquer finement un morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un scalpel stérile
2. Déposer dans un pot à prélèvement environ 1 gramme (=1 cm<sup>3</sup>) de fragment d'organe disséqué
3. Peser le **morceau d'organe** à l'aide d'une balance de précision (= X gramme)
4. Ajouter 10 ml d'eau physiologique par gramme pesé (ou de milieu de culture seul type MEM)
5. Transférer le tout dans un mixer et broyer pendant environ 10-15 secondes
6. Transférer le broyat dans un nouveau pot à prélèvement
7. Prélever 1 ml de broyat et le mettre dans un tube eppendorf de 2 ml
8. Centrifuger 2 min à 1000 g à +4°C
9. Prélever 100 µl de surnageant et les déposer dans un nouveau tube eppendorf de 1.5 ml
10. Réaliser l'extraction d'ARN à partir de ces 100 µl - cf chapitre V

## V - Extraction de l'ARN en colonne

### ➤ Utilisation du kit QIAGEN QIAamp viral RNA mini kit (réf : 52904 ou 52906)

**Extraction du NCS (Contrôle Négatif « Sample ») :** extraire **100 µl d'eau Rnase free**.

**Préparation du Tampon RNA-AVE:** Ajouter **310 µl** de Tampon AVE, fourni avec le kit d'extraction, dans un tube d'ARN carrier du kit (5 tubes par kit de 250 réactions). Vortexer et centrifuger brièvement.

Le tampon RNA-AVE peut être conservé à -20°C entre chaque série d'extraction. Ne pas décongeler ce tampon plus de 3 fois.

#### Préparation du Tampon de Lyse (TL):

Si au moment de l'extraction, le tampon AVL fourni par le kit d'extraction n'est pas homogène (présence de cristaux), il est préconisé de chauffer le tampon AVL avant utilisation (5min à 80°C).

PS : Pour N Echantillons, préparer :

- (N+3) x 560 µl de Tampon AVL
- Ajouter (N+3)\* 5,6 µl de Tampon RNA-AVE

1. Distribuer **560 µL** de Tampon TL dans un microtube de 1,5 mL (identifier le tube)

#### 2. Pour les échantillons:

Ajouter dans le microtube de 1,5 ml contenant le tampon TL, **100 µl** de sang individuel (ou pools de 5 \*) à tester en BTVM, ou **100 µl** de surnageant de broyat ou d'eau (NCS). Vortexer immédiatement pendant 15 secs.

*\* réaliser le pool en homogénéisant à volume équivalent les 5 sangs, (ex : mélanger 100µl de chaque sang, homogénéiser, puis extraire 100µl du mélange homogène obtenu).*

3. Incuber **10 minutes** à température ambiante.

4. Centrifuger rapidement le tube avant ouverture.

5. Ajouter dans le tube **560 µL d'éthanol 100%** - Vortexer immédiatement pendant 15 secs - centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le lysat de l'échantillon.

6. Prendre une mini-colonne du kit QIAamp Viral RNA mini kit (colonne blanche) - identifier la colonne.

7. A l'aide d'une pipette, transférer **630 µL** du lysat de l'échantillon sur la colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000g - jeter le tube collecteur - conserver la colonne.

8. A l'aide d'une pipette, transférer le reste de l'échantillon sur la même colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000g - Jeter le tube collecteur - conserver la colonne.

9. Distribuer **500 µL** de Buffer **AW1** \* (reconstitué) dans chaque colonne - boucher - centrifuger 1 min à 6000g - Jeter le tube collecteur - conserver la colonne.

10. Distribuer **500 µL** de Buffer **AW2**\* (reconstitué) dans chaque colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000g - Jeter le tube collecteur - conserver la colonne.

11. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 ml - centrifuger 3 min à 10000g (*pour sécher la membrane*)

12. Placer la colonne dans un microtube de 1,5ml - distribuer **40 µL** de Buffer AVE du Kit QIAamp Viral RNA - boucher la colonne.

13. Incuber 1 min à température ambiante.

14. Centrifuger 2 min à 6000g pour éluer - jeter la colonne - conserver le microtube identifié.

Après extraction stocker le microtube dans de la glace si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ARN à -20°C. (*Éviter de faire plus de 3 cycles de congélation-décongélation*).

➤ **Utilisation du kit Nucleospin RNA Virus (réf : 740956.250 Macherey Nagel)**

**Extraction du NCS (Contrôle Négatif « Sample ») :** extraire **100 µl d'eau Rnase free**.

**Préparation du Tampon RAV1 - carrier:** Ajouter **1 ml** de tampon **RAV1** dans le tube d'ARN carrier. Vortexer et centrifuger brièvement. Transvaser ces 1ml d'ARN carrier dissout dans le tampon **RAV1** dans le flacon RAV1. Le tampon **RAV1-carrier** ainsi reconstitué est à conserver à 4°C entre 2 et 4 semaines puis à -20°C au delà de 4 semaines. Le tampon **RAV1-carrier** ainsi conservé présente des cristaux. Afin d'homogénéiser le tampon il est préconisé de le chauffer avant utilisation 5 minutes à 70°C si le tampon est conservé à 4°C, et 15 minutes à 70°C si le tampon est conservé à -20°C.

Ne pas décongeler ce tampon plus de 3 fois, il est préconisé d'aliquoter le tampon RAV1-carrier sous 560µl.

1. Distribuer **560 µL** de Tampon **RAV1-carrier** dans un microtube de 1,5 mL (identifier le tube).
2. **Pour les échantillons:**  
Ajouter dans le microtube de 1,5 ml contenant le tampon TL, **100 µl** de sang individuel (ou pools de 5 \*) à tester en BTVM ou **100 µl** de surnageant de broyat ou d'eau (NCS). Vortexer immédiatement pendant 15 secs.  
\* réaliser le pool en homogénéisant à volume équivalent les 5 sangs, (ex : mélanger 100µl de chaque sang, homogénéiser, puis extraire 100µl du mélange homogène obtenu).
3. Incuber **10 minutes** à température ambiante (en cas de sang coagulé, incuber 10 minutes à 70°C).
4. Centrifuger rapidement le tube avant ouverture.
5. Ajouter dans le tube **560 µL d'éthanol 100%** - Vortexer immédiatement pendant 15 secs - centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
6. Prendre une colonne du kit Nucleospin RNA Virus (colonne bleue) - identifier la colonne.
7. A l'aide d'une pipette, transférer **630 µL** du **lysate de l'échantillon** sur la colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000g - jeter le tube collecteur - conserver la colonne.
8. A l'aide d'une pipette, transférer le reste de l'échantillon sur la même colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000g - Jeter le tube collecteur - conserver la colonne.
9. Distribuer **500 µL** de **Buffer RAW** dans chaque colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000g - Jeter le tube collecteur - conserver la colonne.
10. Distribuer **630 µL** de **Buffer RAV3** (reconstitué) dans chaque colonne - boucher - centrifuger 1 min à 10000 g - Jeter le tube collecteur - conserver la colonne.
11. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 ml - centrifuger 3 min à 10000g (*pour sécher la membrane*)
12. Placer la colonne dans un microtube de 1,5ml - distribuer **50 µL** d'eau RNase-free du Kit Nucleospin RNA Virus - boucher la colonne.
13. Incuber 1 min à température ambiante.
14. Centrifuger 1 min à 10000g pour éluer - jeter la colonne - conserver le microtube identifié.

Après extraction stocker le microtube dans de la glace si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ARN à -20°C. (*Éviter de faire plus de 3 cycles de congélation-décongélation*).

## VI - Extraction de l'ARN en plaque

### ➤ Utilisation du kit Macherey Nagel Nucleospin 8/96 Virus kit (réf : 740691.4)

Les réactifs du kit Nucleospin 8/96 Virus Kit sont à conserver et à utiliser à température ambiante (15-25°C). Seul le tampon RAV1 sera conservé à -20°C.

Reconstituer les tampons de lavage en suivant les indications du kit.

**Extraction du NCS / T- ext (Contrôle Négatif « Sample ») :** extraire **100 µl d'eau Rnase free**.

**Préparation du Tampon RAV1:** Ajouter **1 ml** de tampon RAV1, fourni avec le kit d'extraction, dans un tube d'ARN carrier du kit. Vortexer brièvement. Transvaser ce 1 ml dans le flacon de tampon RAV1. Le tampon RAV1-RNA carrier peut être conservé à + 4°C pendant 2 à 4 semaines, ou à -20°C entre chaque série d'extraction. Ne pas décongeler ce tampon plus de 4 fois. Si au moment de l'extraction, le tampon n'est pas homogène (présence de cristaux), il est préconisé de le chauffer avant utilisation (5min à 80°C).

1. Sous un poste de sécurité microbiologique : dans chaque puits d'un **MN Round-Well-Block**, prélever **100 µl** de chaque sang, ou **100 µl** de surnageant de broyat. Pour les témoins négatifs d'extraction, 100 µl d'eau sont prélevés. (Prévoir 2 témoins négatifs pour une plaque)
2. Ajouter **400 µl** du tampon RAV1 dans chaque puits contenant les 100µl de sang ou d'eau (témoin négatif d'extraction) et **20 µl** de Protéinase K. Mélanger en pipetant plusieurs fois (4-5 fois) et fermer le MN Round-Well-Block avec des bouchons.
3. Incuber le MN Round-Well-Block à **70 °C** pendant **10 minutes minimum**.

*Rq : (si la plaque a été retournée plusieurs fois pour l'homogénéisation, une centrifugation sera nécessaire pour faire redescendre les gouttelettes présentes sur les bouchons avant l'étape suivante)*

4. Répartir **400 µl d'éthanol 100%** dans une plaque **MN Square-Well block**. Oter les bouchons et transférer la totalité de chaque puits dans la plaque MN Square Well block contenant l'éthanol 100%.
5. Mélanger en pipetant plusieurs fois (10-15 fois).
6. Prendre une plaque **Nucleospin Virus Binding Strip** et placer la sur un MN Square Well-Block. Transférer la **totalité** des échantillons dans la plaque Nucleospin Virus Binding Strip. Couvrir la plaque Nucleospin Virus Binding Strip avec un film. Centrifuger 2 min à 5600 g.
7. Oter le film et ajouter **500 µl** du tampon RAW dans chaque puits de la plaque (tampon de lavage du kit). Couvrir la plaque avec un nouveau film et centrifuger pendant 2 min à 5600 g.
8. Oter le film, placer la plaque sur un nouveau MN Square Well Block et ajouter **700 µl** du tampon RAV3 dans chaque puits de la plaque (tampon de lavage du kit). Couvrir la plaque et centrifuger pendant 2 min à 5600 g.
9. Oter le film, placer la plaque sur le MN Square Well Block et ajouter **700 µl** du tampon RAV3 dans chaque puits de la plaque (tampon de lavage du kit). Couvrir la plaque et centrifuger pendant 15 min à 5600 g (Élimination de traces du tampon RAV3).
10. Placer la plaque Nucleospin Virus Binding Strip sur une **elution rack avec MN Tube Strips**. Distribuer **80 µl d'eau préchauffée à 70 °C** dans chaque puits de la plaque Nucleospin Virus Binding Strip. Changer de cône entre chaque échantillon.
11. Incuber pendant 1-2 min à température ambiante.
12. Couvrir la plaque et centrifuger pendant 2 min à 5600 g. Retirer la plaque Nucleospin Virus Binding Strip et boucher les tubes.

Garder à 4°C les ARNs élués s'ils sont utilisés dans les 24 heures ou congeler à -20°C s'ils sont utilisés ultérieurement.

## VII - Automatisation de l'extraction de l'ARN

### ➤ Utilisation des automates KingFisher® 96 / Flex et MagMAX Express™

Ces automates permettent l'extraction simultanée de **96 échantillons (KingFisher® 96 / Flex) ou de 24 échantillons (MagMAX Express™)**. Après la distribution des divers tampons dans des plaques de type *deep well* ou microplaques, ces automates fonctionnent en totale autonomie durant l'extraction.

La recherche du virus de la Bluetongue a été validée sur ces deux automates par le Laboratoire National de Référence FCO (LNR FCO de Maisons Alfort).

*Remarque* : le programme d'extraction pour la recherche du virus de la Bluetongue et du virus de la BVD est commun.

Pour plus d'informations ou pour obtenir de la documentation, vous pouvez écrire aux adresses mails suivantes : [lise@lsivet.com](mailto:lise@lsivet.com) (service commercial) ou [jcharrot@lsivet.com](mailto:jcharrot@lsivet.com) (service PCR).

## VIII - Reconstitution des Mix

Le mix de RT-PCR est prêt à l'emploi, il ne nécessite donc aucune reconstitution de mix de réactifs avant l'ajout de l'extrait d'ARN à tester.

## IX - Dénaturation des ARNs viraux

Pour chaque échantillon, incluant les témoins négatifs d'extraction et les témoins positifs (EPC, ARN A et ARN B) de RT-PCR :

- Mettre dans une plaque 96 puits, 1 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde) et ajouter 10 µl de chaque ARN par puits.
- Sceller les puits avec des barrettes de bouchons de tailles correspondantes.
- Centrifuger la plaque.
- Chauffer pendant 3 minutes à 95°C dans le thermocycleur, puis déposer la plaque dans la glace pilée ou sur un bloc réfrigéré (4°C) jusqu'à utilisation.

*Les ARN dénaturés sont à conserver à 4°C si l'amplification est réalisée tout de suite et à -20°C s'ils sont utilisés ultérieurement.*

## X- Protocole d'amplification

### X-a / Sur un thermocycleur ABI 7000, 7300 ou 7500

**Création du plan de plaque :**

Prendre une plaque ou des barrettes pour PCR temps-réel et créer le plan de plaque :

- a. Si besoin, utiliser « ROX » comme Référence Passive.
- b. Créer 2 Cibles :

| BTVM: Reporter Fam, Quencher: None  
| IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA

c. Réaliser le plan de plaque :

**Plan de plaque Monocupule :**

	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM	BTVM
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC	7	15	23	NCS	38	46	54	62	70	78	86
B	NC	8	16	24	31	39	47	55	63	71	79	87
C	1	9	17	25	32	40	48	56	64	72	80	88
D	2	10	18	26	33	41	49	57	65	73	81	89
E	3	11	19	27	34	42	50	58	66	74	82	90
F	4	12	20	28	35	43	51	59	67	75	83	91
G	5	13	21	29	36	44	52	60	68	76	84	92
H	6	14	22	30	37	45	53	61	69	77	85	NCS

L'EPC est utilisable à la place des ARNs A et B

NC : témoin négatif de RT-PCR : Mix Réactionnel

NCS : Témoins négatifs d'extraction

1. Agiter les tubes de chaque Mix BTVM puis centrifuger rapidement avant ouverture.
2. Déposer **20 µL de Mix BTVM** dans les puits correspondant de la plaque PCR (Cf. plan de plaque ci-dessus)
3. Déposer **5 µL d'échantillon d'ARN dénaturé**
4. Couvrir la plaque avec un film transparent adapté et lancer l'amplification selon le programme suivant :

**Etape 1 : 45 °C - 10 minutes - Répétition : 1**

**Etape 2 : 95 °C - 10 minutes - Répétition : 1**

**Etape 3 : 95 °C - 15 secondes et 60 °C - 45 secondes - Répétitions : 40**

- Lecture de la fluorescence pendant l'étape d'élongation : 60 °C - 45 secondes
- Ce programme a été validé par LSI, sur les appareils suivants :
  - Slan (LSI)
  - Abiprism 7000 (émulation 9600), 7300, 7500, 7700 (Applied Biosystems)
  - Chromo 4 (Biorad)
  - MX3000P et MX3005P (Stratagene)

Nous sommes à votre disposition pour examiner vos résultats : nous envoyer par email les fichiers sur : [contact@lsivet.com](mailto:contact@lsivet.com)

[X-b / Sur un thermocycleur Light Cyler 2.0](#)

**Attention : les kits de PCR temps réel TaqVet™ sont utilisables sur LightCyler 2.0 après calibration de l'appareil à l'aide du « kit de Compensation » disponible chez LSI.**

- Ouvrir une nouvelle feuille « Light Cyler experiment ». Lancer le self-test de l'appareil (onglet « Option » ; « self-test »). Dans la feuille « Sample » :
  - indiquer le nombre d'échantillons à passer « sample count »
  - sélectionner les canaux de lecture **530** (pour détecter **BTV**) et **560** (pour détecter l'**IPC**)
  - sélectionner « Absolute Quantification » dans l'onglet « Analysis Type »

Créer le programme d'amplification RT-qPCR suivant :

Programme	Répétition	Slope (°C/s)	Acquisition mode	Etape
45° C pendant 10:00	x 1 cycle	20° C/s	none	Reverse Transcription
95° C pendant 10:00	x 1 cycle	20° C/s	none	Dénaturation + activation de la Taq Polymérase
<b>95° C pendant 00:15</b>	<b>40 cycles</b>	<b>2.5° C/s</b>	none	Dénaturation
<b>60° C pendant 00:45</b>		<b>2.5° C/s</b>	single	Fixation primers + élongation
40° C pendant 00:30	x 1 cycle	20° C/s	none	Cooling

- Agiter le « Mix BTVM » puis centrifuger rapidement avant ouverture. La réaction est réalisée en monocupule.
  - Déposer **20 µL de « Mix BTVM »** dans les capillaires qui seront utilisés pour l'essai.
  - Déposer **5 µL d'échantillon** (RNA extrait et dénaturé) dans les capillaires qui seront utilisés pour l'essai.
- Boucher les capillaires, les fixer sur le carrousel et centrifuger. Vérifier le volume réactionnel dans chaque capillaire et placer le carrousel dans le Light Cyler. Lancer l'amplification « Start Run ».
- Lecture des résultats : cliquer sur l'application « Analyse », choisir la longueur d'onde de lecture et **appliquer le fichier de compensation LSI pour chacune des cibles (la cible BTV est lue à 530nm et l'IPC est lu à 560nm).**

Nous sommes à votre disposition pour examiner vos résultats : vous pouvez nous envoyer par email le fichier de run à l'adresse suivante : [contact@lsivet.com](mailto:contact@lsivet.com)

## XI- Interprétation des résultats :

**Notion de Seuil ou Threshold :** Le seuil ou threshold (Threshold : terme anglophone utilisé dans les logiciels des thermocycleurs), sont des termes caractérisant le point de lecture et d'analyse en PCR temps réel. Pour les placer, il suffit de fixer le threshold au milieu de la partie linéaire en vue « logarithmique ». Le threshold pour l'analyse BTVM est généralement placé vers 0,1 en FAM et 0,1 en VIC.

### Validation du test :

#### Contrôles Positifs

- Ct EPC BTVM : Ct « EPC Validé » de l'EPC BTVM Pur (Cf Certificat de Contrôle Qualité)
- Ct EPC BTVM dilué au 1/10<sup>ème</sup> : Ct « EPC Validé » de l'EPC BTVM 10<sup>-1</sup> (Cf Certificat de Contrôle Qualité)

Ne pas prendre en compte le Ct IPC obtenu avec l'EPC fourni par LSI.

#### Contrôles négatifs

- Ct NCS/ T-ext : BTVM > 40
- Ct NCS/ T-ext : IPC > 40
- Ct NC/ NTC : BTVM > 40
- Ct NC/ NTC : IPC > 40

### Interprétation des résultats

Interprétation	Ct Mix BTVM	
	« Detector » BTVM / $\lambda=530\text{nM}$	« Detector » IPC / $\lambda=560\text{nM}$
Positif	Ct < 34	Ct < 30
Faible positif	$40 \geq \text{Ct} \geq 34$	Ct < 30
Négatif	Ct > 40	Ct < 30
Non validé	Ct > 40	Ct $\geq 30$

### Rendu de résultats sur échantillons individuels et mélanges

Pour les échantillons négatifs : « Absence du génome du virus de la fièvre catarrhale ovine »

Pour les échantillons positifs à un Ct inférieur à 40 « Présence du génome du virus de la fièvre catarrhale ovine »

### Interprétations des résultats

1/ Pour les contrôles avant mouvements d'exportations / importations, tous les animaux ayant un Ct inférieur à 40 sont considérés comme positifs.

2/ Pour le diagnostic de suspicion clinique, les animaux ayant un Ct inférieur ou égal à 34 sont considérés comme positifs : « lien direct entre la clinique et la positivité ».

Pour les animaux ayant un Ct supérieur à 34 et inférieur à 40, faibles positifs, « le statut de l'animal ne peut être défini ». L'infection peut être très récente (début de virémie) ou ancienne (détection du génome BTV jusqu'à 200 jours après infection), dans ce dernier cas, le virus n'est alors plus infectieux.

**Conduite à tenir pour les échantillons non validés :**

1/ Diluer l'ARN de l'échantillon non validé comme indiqué :

- Dilution de l'ARN au 1/5 : 3 µl d'ARN « non validé » + 12 µl d'eau RNase free.

2/ Faire une nouvelle analyse PCR sur 5 µl de cette dilution.

3/ Si l'ARN « non validé » dilué est positif ou négatif en BTVM avec un résultat IPC positif (Ct Detector IPC <30), le résultat obtenu est alors validé.

4/ Si l'ARN « non validé » dilué est négatif avec un résultat IPC négatif (Ct Detector IPC ≥30), le résultat obtenu n'est toujours pas validé. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon « non validé » en le pré-diluant au 1/2 dans du PBS sans Calcium et Magnésium, avant extraction (50µl de sang EDTA et 50µl de PBS).

5/ Si l'ARN est à nouveau « non validé » (Ct Detector IPC ≥ 30), on considérera que l'échantillon est inexploitable (présence d'inhibiteurs de RT-PCR ; échantillon lysé ou putréfié...). Dans ce cas, contacter la Direction Départementale des Services Vétérinaires et demander un nouveau prélèvement de sang de l'animal.